

Chemical or biochemical assay, involving electrochemically assessing a change in diffusion coefficient of redox-active species due to a specific binding reaction, useful e.g. for determining antigens or DNA fragments

Publication number: DE19917052

Publication date: 2000-10-19

Inventor: MOSBACH MARCUS (DE); SCHUHMANN WOLFGANG (DE)

Applicant: SCHUHMANN WOLFGANG (DE)

Classification:

- international: C12Q1/68; G01N33/543; C12Q1/68; G01N33/543; (IPC1-7): G01N27/416

- European: C12Q1/68B2H; G01N33/543K2B

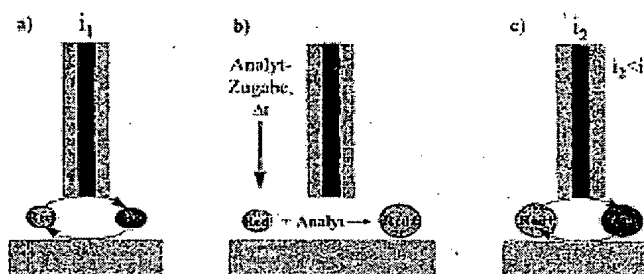
Application number: DE19991017052 19990415

Priority number(s): DE19991017052 19990415

[Report a data error here](#)

Abstract of DE19917052

A method for the determination of chemical or biochemical analytes (A) comprising modulating the diffusion coefficient of a redox-active species coupled with a specific recognition element by binding with a complementary recognition structure and electrochemically detecting the modulation of the diffusion coefficient, under amplification by recycling the redox species, is new. An Independent claim is also included for apparatus for carrying out the method, comprising an electrochemical measuring cell of volume 10 μ l to 1 ml (preferably less than 300 μ l) with a reference electrode, counter-electrode and macroscopic regeneration surface, in which a micro-electrode of active diameter 0.1-500 μ m can be positioned adjacent to the regeneration surface using positioning elements. In alternative forms of the apparatus: (a) the cell is formed by an array of measuring cells, especially of the microtiter plate type, the base of which forms a one combined or several separate conductive regeneration surfaces; (b) the cell has no walls contacting the reaction solution; or (c) several microelectrodes can be placed in parallel (using positioning elements) in several measuring cells or drops of the determination solution can be applied to each measuring surface, so that several samples can be tested simultaneously.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 199 17 052 A 1

51 Int. Cl. 7:
G 01 N 27/416

21 Aktenzeichen: 199 17 052.5
22 Anmeldetag: 15. 4. 1999
43 Offenlegungstag: 19. 10. 2000

DE 199 17 052 A 1

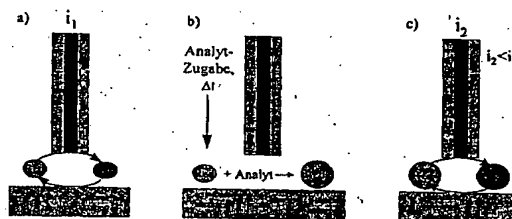
71 Anmelder:
Schuhmann, Wolfgang, Prof. Dr., 44799 Bochum,
DE

72 Erfinder:
Mosbach, Marcus, 44627 Herne, DE; Schuhmann,
Wolfgang, 44799 Bochum, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Vorrichtung und Verfahren zur Bestimmung chem. und biochem. Analyten mittels amplifizierter mikro-elektrochem. Detektion

57 Technische Aufgabe und Zielsetzung
Ein sensitives elektrochemisches Assay-System für die qualitative und/oder quantitative Bestimmung von Substanzen in einer komplexen Matrix soll entwickelt werden.
Lösung der technischen Aufgabe
Die Lösung erfolgt durch ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der Diffusionskoeffizient einer redoxaktiven Spezies, die mit einem spezifischen Erkennungselement gekoppelt ist, durch Anbindung einer komplementären Erkennungsstruktur moduliert wird, und die Modulation des Diffusionskoeffizienten mit einem elektrochemischen Verfahren unter Verstärkung durch Recycling der Redoxspezies detektiert wird. Die Lösung der Aufgabe betrifft weiterhin die Konzeption von Vorrichtungen, welche die Durchführung des Verfahrens ermöglichen, wobei zusätzlich das Verfahren sequentiell oder parallel auf mehrere Analytproben angewandt werden kann.
Anwendungsgebiet
Klinische Analytik, Umweltanalytik, Screeningverfahren



a) Annäherung der Mikroelektrode an die Regenerationsoberfläche und Bestimmung des Stromes i_1 . b) Zugabe des Analyten und Inkubation. c) Bestimmung des Stromes i_2 nach Inkubation mit dem Analyten und Auswertung anhand von Kalibrierkurven

DE 199 17 052 A 1

1 Darstellung des technischen Gebietes

Die Erfindung betrifft Vorrichtungen und Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung eines oder mehrerer chemischer und biochemischer Analyte. Durch selektive Bindung des Analyten an ein komplementäres spezifisches Erkennungselement, das mit einer elektrochemisch aktiven Substanz (einem Redoxmediator) modifiziert ist, wird der Diffusionskoeffizient dieses Redoxmediators moduliert. Die Veränderung des Diffusionskoeffizienten des Redoxmediators und damit der Massentransport zur Oberfläche einer geeigneten Elektrode wird mit Hilfe einer Meßelektrode detektiert. Eine Verstärkung des Meßeffektes wird durch die lokale elektrochemische Regenerierung des Redoxmediators an einer leitenden Oberfläche oder Elektrode in unmittelbarer Nähe der Meßelektrode erreicht.

2 Technischer Hintergrund

2.1 Bindungsassays

Die Erkennung und Quantifizierung von Bindungsereignissen zwischen komplementären Erkennungsstrukturen wie Antigen/Antikörper, Hapten/Antikörper, Enzym/Substrat, Lectin/Kohlenhydrat, Rezeptor/Hormon, Oligonukleotid/DNA- oder RNA-Halbstrang dient als Grundlage sogenannter Assays, die einen wichtigen Bereich der klinischen, biochemischen und chemischen Analytik darstellen. Infolge der selektiven Erkennung der komplementären Strukturelemente können entsprechende Analyte zumeist ohne aufwendige Abtrennung in ihrer komplexen Matrix qualitativ und/oder quantitativ bestimmt werden. Der Einsatz solcher Assays wird durch ihre Selektivität, die im wesentlichen durch die Bindungskonstante für die dem Erkennungsvorgang zugrunde liegende Reaktion bestimmt ist, durch ihre Sensitivität, den notwendigen Zeitaufwand, die notwendigen Reagenz- und Analytvolumina, ihre Automatisierbarkeit und durch den Preis bestimmt.

2.2 Redoxreaktionen an Mikroelektroden

Wird eine Elektrode auf ein geeignetes konstantes Potential gegenüber einer Referenzelektrode mit Hilfe eines Potentiostaten polarisiert, kann eine sich in Lösung befindliche Redoxspezies entsprechend des Potentials oxidiert bzw. reduziert werden. Infolge des Umsatzes der Redoxspezies an einer Mikroelektrode entsteht ein Konzentrationsgradient vom Volumen der Lösung in Richtung der Elektrode, was den Aufbau eines hemisphärischen Diffusionsfeldes vor der Mikroelektrode zur Folge hat, in dem die Redoxspezies durch Diffusion zur Elektrodenoberfläche transportiert wird. Wird die Konzentration der umzusetzenden Redoxspezies am Ort der Elektrode gleich null, limitiert der diffusionelle Massentransport den Umsatz an der Elektrode, und man erhält als Maximalstrom den sogenannten Diffusionsgrenzstrom.

2.3 Elektrochemisches Recycling

Wird eine Mikroelektrode, an der diffusionslimitiert eine Oxidations- oder Reduktionsreaktion eines im Elektrolyten gelösten Redoxmediators abläuft, an eine makroskopische, leitende Oberfläche so weit angenähert, daß das hemisphärische Diffusionsprofil vor der Mikroelektrode durch diese Oberfläche gestört wird, kann – bei geeignetem Potential an der makroskopischen Elektrode – die Rückreaktion der an

der Mikroelektrode stattfindenden Reaktion ablaufen. Infolge dieser Rückreaktion werden im Volumenraum des Diffusionsprofils in der Zeiteinheit die Zahl der an der Mikroelektrode umzusetzenden Redoxspezies vergrößert, so daß als Folge der Diffusionsgrenzstrom anwächst. Diese Amplifizierung ist abhängig von der Konzentration der Redoxspezies, von der heterogenen Elektronentransferkinetik an der Mikroelektrode und der leitenden Oberfläche, sowie insbesondere vom Abstand der Mikroelektrode zur gegenüberliegenden Oberfläche. Diese Amplifizierung durch Recycling der Redoxkomponente wird im Folgenden "positiver Feedback" genannt.

3 Stand der Technik

Die bisher beschriebenen Sensoren und Testverfahren zur Erkennung und Quantifizierung von Bindungsereignissen zwischen komplementären biologischen oder chemischen Strukturen beruhen überwiegend auf dem Nachweis einer Markierung (Enzym, Fluoreszenzmarker, Radioisotop), die durch aufwendige Syntheseschritte an kompetitiv wirksamen Erkennungsstrukturen angebracht werden müssen. Diese markierten Analytderivate müssen bei einem kompetitiven Assay der Probe zugesetzt werden, so daß sie verbraucht werden. Obwohl die Analysevolumina sehr stark reduziert wurden, stellt der Verbrauch der markierten Analytmoleküle bei kompetitiven Assays einen wesentlichen Kostenfaktor dar.

Direkte Meßverfahren, also solche, bei denen das Bindungsereignis ohne Zugabe markierter Analytmoleküle detektiert werden kann, beruhen überwiegend auf optischen Detektionsmethoden unter Nutzung des evaneszenten Feldes elektromagnetischer Wellen an Grenzflächen unterschiedlicher Brechungsindizes (Oberflächen-Plasmonen-Spektroskopie, Gitterkoppler, Interferometrie, Ellipsometrie) oder der Beobachtung von Massenänderungen mit einem Schwingquarz oder Oberflächenwellensensor (SAW). Im Allgemeinen ist dabei ein Partner der komplementären Erkennungsreaktion an der Oberfläche des Meßsystems immobilisiert, da Brechungsindexänderungen nur in der Abklingdistanz des evaneszenten Feldes (ca. 100 nm) detektiert werden können, bzw. die Resonanzfrequenz bei Mikrowaagen nur durch oberflächengebundene Strukturen wirksam moduliert werden kann. Derartige Assays sind häufig apparativ aufwendig und müssen zumeist für jeden Anwendungsfall optimiert werden.

Obwohl elektrochemische Verfahren hinsichtlich der apparativen Anforderungen einfach sind, wurden sie aufgrund der geringen Sensitivität nur wenig für Assays eingesetzt. Insbesondere mikroelektrochemische Assays auf der Basis der besonderen Eigenschaften von Ultramikroelektroden sind bisher wenig untersucht.

Sugawara et al. beschrieben direkte elektrochemische Assays für das Biotin-Avidin-System. Entweder wurde Biotin mit Daunomycin (Talanta, 1997, 44, 357–363; Analytical Chemistry, 1995, 67, 299–302) oder mit Nil-Blau (Bioelectrochemistry & Bioenergetics, 1996, 41 (2), 167–172) als elektrochemisch aktiver Gruppe markiert oder Biotin-Hydrazid wurde als elektrochemisch aktives Biotinderivat (Bioelectrochemistry & Bioenergetics, 1994, 33, 205–207) benutzt. Binden die oben genannten Biotinderivate an Avidin, so werden die elektrochemisch aktiven Molekülteile mit in die Bindungstasche des Avidins gezogen, was in allen beschriebenen Fällen zu einem Verlust der elektrochemischen Aktivität führt. Die Nachteile dieser Verfahren sind, daß der beschriebene Mechanismus auf das Avidin-Biotin-System beschränkt ist und somit nicht auf beliebige Analyten zu übertragen ist. Weiterhin ist, infolge der notwendigen

intensiven Vorbehandlung der Meßelektroden vor jeder Messung, die schnelle Untersuchung einer großen Anzahl von Proben nicht möglich.

Elektrochemische Verstärkung als Folge von Recyclingprozessen wurde für Interdigitalstrukturen (Paeschke et al.: *Sensors & Actuators B-Chemical*, 1995, 27, 394-397; Paeschke et al.: *Analytica Chimica Acta*, 1995, 305, 126-136; Hintsche et al.: *Biosensors & Bioelectronics*, 1994, 9, 697-705) und als Methode zur Abbildung der elektrochemischen Aktivität von Oberflächen mittels der elektrochemischen Rastermikroskopie (SECM) (Horrocks et al.: *Anal. Chem.*, 1993, 65, 3605-3614; Pierce et al.: *Anal. Chem.*, 1992, 64, 1795) beschrieben.

Interdigitalelektroden besitzen aufgrund des konstanten Abstandes zwischen den Elektrodenkämmen ein festes Verstärkungsverhältnis. Der positive Feedback-Effekt beim SECM wurde bisher nicht zur Entwicklung amplifizierter Assays genutzt.

4 Aufgabe der Erfindung

Der hier beschriebenen Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein sensitives elektrochemisches Assay-System für die qualitative und/oder quantitative Bestimmung von Substanzen in einer komplexen Matrix zu entwickeln. Die Selektivität wird durch die molekulare Erkennung zwischen Strukturbereichen der zu analysierenden Substanz und einem komplementären, mit einer redoxaktiven Gruppe modifizierten Bindungspartner gewährleistet. Das Verfahren und die zur Durchführung des Verfahrens notwendigen Vorrichtungen sollen prinzipiell die Analyse beliebiger komplexer Bindungsereignisse erlauben, über eine variable Verstärkung zur Anpassung des Meßbereiches verfügen, und in sehr kleinen Reaktionsvolumina durchgeführt werden können. Die Möglichkeit zur Miniaturisierung impliziert gleichzeitig die Parallelisierung der Verfahren und der Vorrichtungen sowie den extrem geringen Verbrauch notwendiger Reagenzien.

5 Erfindungsgemäße Lösung der Aufgabe

Die erfindungsgemäße Lösung der Aufgabe erfolgt durch ein Verfahren zur Bestimmung von chemischen oder biochemischen Analyten, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der Diffusionskoeffizient einer redoxaktiven Spezies, die mit einem spezifischen Erkennungselement gekoppelt ist, durch Anbindung einer komplementären Erkennungsstruktur moduliert wird, und die Modulation des Diffusionskoeffizienten mit einem elektrochemischen Verfahren unter Verstärkung durch Recycling der Redoxspezies detektiert wird. Dabei ist das Verfahren durch eine Meßelektrode gekennzeichnet, die als Makro- oder Mikroelektrode mit einem aktiven Durchmesser zwischen 0.1 und 500 µm, bevorzugt 1-100 µm, insbesondere 10-50 µm ausgebildet ist, wobei die aktive Scheibenelektrode von einem isolierenden Mantel aus Glas oder Polymeren umgeben ist, der die Diffusion von Redoxspezies zur aktiven Elektrodenoberfläche moduliert. Die Meßelektrode wird mittels Positionierelementen einer makroskopischen leitenden Oberfläche soweit angenähert, daß das Diffusionsprofil der mit einem spezifischen Erkennungselement gekoppelten Redoxspezies durch diese Oberfläche verändert wird. Das an den Redoxmediator gekoppelte Erkennungselement kann alternativ Biotin, ein Hapten, ein Antigen, ein Antikörper, ein Lectin, ein Kohlehydrat, ein DNA-Fragment, ein DNA-Halbstrang, ein RNA-Fragment, ein Oligonucleotid, ein Hormon, ein Rezeptor oder ein künstliches Wirtsmolekül sein, für das eine komplementäre Erkennungsstruktur existiert, die selektiv gebunden werden

kann. Alternativ kann auch über eine Zwischenstruktur mit mehr als einer Bindungsstelle der Redoxmediator und der Analyt spezifisch erkannt und gebunden werden kann, so daß ein Sandwich-Assay entsteht. Das Signal des zur Anwendung kommenden elektrochemischen Verfahrens muß durch den Diffusionskoeffizient der Redoxspezies bestimmt werden. Die erfindungsgemäße Lösung der Aufgabe betrifft weiterhin die Konzeption von Vorrichtungen die die Durchführung des Verfahrens ermöglichen. In einer ersten Vorrichtung wird in einer Meßzelle mit Referenzelektrode, Gegenelektrode und makroskopischer Regenerationsoberfläche mit einem Volumen von 10 µl-1 ml, bevorzugt einem Volumen < 300 µl eine Mikroelektrode mittels Positionierelementen an die Regenerationsoberfläche angenähert. Eine zweite Vorrichtung ist dadurch gekennzeichnet, daß die elektrochemische Meßzelle als ein Meßzellenarray ausgebildet ist, insbesondere nach Art von Mikrotiterplatten, dessen Boden eine gemeinsame leitende Regenerationsoberfläche bilden. Eine dritte Vorrichtung benutzt einen Flüssigkeitstropfen als wandfreie "Meßzelle", in die die Redoxmediatorlösung über eine die Mikroelektrode umschließende Kapillare zudosiert wird, so daß sich ein das leitende Substrat und die Spitze der Mikroelektrode umgebender Tropfen bildet.

Prinzipiell ist es möglich, das Verfahren unter Nutzung der unterschiedlichen Vorrichtungen sequentiell durch Repositionierung der Mikroelektrode in verschiedenen Meßzellen eines Arrays durchzuführen, wobei mehrere Proben unter Nutzung einer gemeinsamen leitenden Regenerationsoberfläche vermessen werden können.

Weiterhin gelingt es, mittels unabhängiger Positionierelemente mehrere Mikroelektroden parallel in mehreren Meßzellen oder Tropfen der Meßlösung an die jeweilige Regenerationsoberfläche anzunähern, so daß gleichzeitig mehrere Proben vermessen werden können.

6 Beschreibung der Erfindung

In dem erfindungsgemäßen Verfahren und den zugehörigen Vorrichtungen wurde ein neuartiges Assay-System konzipiert, das die Modulation des Diffusionskoeffizienten einer mit einem Erkennungselement modifizierten redoxaktiven Spezies als Folge der Anbindung eines komplementären Bindungspartners nutzt, um qualitative und quantitative Informationen über das Vorhandensein und die Konzentration des Analyten zu erhalten. Als Detektionssystem wird dazu eine Mikroelektrode benutzt, an der bei einem geeigneten Potential der im Elektrolyt gelöste, mit dem Erkennungselement modifizierte Redoxmediator diffusionskontrolliert oxidiert bzw. reduziert wird. Die molekulare Erkennung des Bindungspartners führt unter anderem zu einer Vergrößerung des Molekulargewichtes und damit verbunden zu einer Modulation des Diffusionskoeffizienten der Redoxspezies, was durch eine Verminderung des Massentransports zur Mikroelektrode zu einer Verringerung des Diffusionsgrenzstromes führt. Die Detektion des diffusionsabhängigen Faraday'schen Stromes an der Mikroelektrode kann statisch bei einem der Mikroelektrode aufgeprägten konstanten Potential oder dynamisch mittels cyclischer Voltammetrie, Differential-Puls-Voltammetrie, Potentialsprung-Techniken etc. erfolgen. Zur Signalamplifizierung als Voraussetzung für eine Erhöhung der Sensitivität und der möglichen Anpassung der Kalibrierfunktion an die tatsächlich vorliegende Analytkonzentration wird die Meßelektrode (eine Mikroelektrode mit einem typischen Radius < 100 µm in einer Isolationshülle mit einem mehrfachen Durchmesser der aktiven Elektrodenfläche (Abb. 1) mittels Verschiebeelemente (z. B. Schrittmotor-getriebene oder manuelle Mikrometer-

schrauben, Piezostapel) an eine gegenüberliegende, leitende Oberfläche angenähert, so daß das Diffusionsprofil der Redoxspezies vor der Mikroelektrode bis zur gegenüberliegenden leitenden Oberfläche reicht (Abb. 2). Die Regeneration des Redoxmediators an dieser Oberfläche ist entweder bedingt durch die Einstellung des Nernspotentials in weiter Entfernung der positionierten Mikroelektrode oder wird durch das Aufprägen eines geeigneten Potentials mittels eines Bipotentiostaten erzwungen. Diese Regeneration des Redoxmediators führt zu einer durch den Abstand der Mikroelektrode in weiten Grenzen wählbaren Amplifizierung des Stromes in Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten der an der Mikroelektrode umgesetzten Redoxspezies.

Ein vollständiger analytischer Zyklus ist aus mindestens 4 Verfahrensschritte aufgebaut (Abb. 3):

- Bestimmung des durch Umsatz des mit der spezifischen Erkennungsstruktur modifizierten Redoxmediators erzeugten Faraday'schen Stromes an der Mikroelektrode in Abhängigkeit des Abstandes Mikroelektrode/Regenerationsoberfläche.
- Zugabe der Probe zur Lösung des Redoxmediators und Inkubation für einen festgelegten Zeitraum, der im wesentlichen von der Bindungskonstante der komplementären Erkennungsstrukturen bestimmt wird.
- Bestimmung des durch Umsatz des mit dem Komplex zwischen den komplementären Erkennungsstrukturen modifizierten Redoxmediators erzeugten Faraday'schen Stromes an der Mikroelektrode in Abhängigkeit des Abstandes Mikroelektrode/Regenerationsoberfläche.
- Auswertung der Stromabnahme mittels Kalibrierfunktionen unter Berücksichtigung der Volumenveränderung des Elektrolyten nach Zugabe des Analyten und des durch Recycling des Redoxmediators erhaltenen Verstärkungseffektes.

Für die erfindungsgemäße Durchführung der Analysenverfahren wurden unterschiedliche Vorrichtungen konzipiert, die den verschiedenen Einsatzmöglichkeiten der Assays hinsichtlich Zahl der Proben und verfügbarem Probenvolumen Rechnung tragen.

1. Vorrichtung zur Bestimmung von chemischen oder biochemischen Analyten über die Anbindung an eine elektrochemisch aktive Substanz mit Hilfe von Mikroelektroden, welche gekennzeichnet ist durch, eine elektrochemische Zelle mit einem Volumen ≤ 10 ml, bevorzugt ≤ 1 ml, insbesondere ≤ 300 μ l mit Referenzelektrode, Gegenelektrode, Vorrichtungen zum Entgasen der Lösung und zum Überleiten von Schutzgas über die Lösung, sowie einer leitenden ebenen kontaktierbaren Elektrode auf dem Meßzellenboden. Die Vorrichtung ist darüberhinaus gekennzeichnet durch eine Scheibenmikroelektrode mit einem Durchmesser der elektrochemisch aktiven Oberfläche von 0.1 – 1000 μ m, bevorzugt 10 – 50 μ m, einer mit Motoren bevorzugt Schrittmotoren, manuell und/oder Piezoelementen getriebenen Feinverstelleinheit für die Höhenpositionierung der Scheibenmikroelektrode relativ zur Regenerationsoberfläche auf dem Meßzellenboden, optional einer mit Motoren, bevorzugt Schrittmotoren, manuell oder mit Piezoelementen getriebenen Einheit zur lateralen Verschiebung der Meßzelle, einen Potentiostaten und einen Personal-Computer zur Steuerung des Potentiostaten und der Verstelleinheiten, sowie zur Meßwertaufnahme und Meßwertverarbeitung (Abb. 4).
2. Vorrichtung zur schnellen sequentiellen Bestimmung

von chemischen oder biochemischen Analyten über die Anbindung an eine elektrochemisch aktive Substanz mit Hilfe von Mikroelektroden, welche gekennzeichnet ist durch einen Meßzellenverbund (analog einer Mikrotiterplatte), deren Boden leitfähig beschichtet ist. Die Referenz- und Gegenelektrode werden zusammen mit der als Meßelektrode dienenden Scheibenmikroelektrode in die jeweils zu vermessende Meßzelle des Verbundes eingetaucht. Da Größe, Zahl und Abstände zwischen den Meßzellen bekannt sind, lassen sich die einzelnen Meßzellen automatisiert sequentiell mit der Mikroelektrode über die lateralen Verstelleinheiten anfahren und vermessen (Abb. 5).

3. Vorrichtung zur Bestimmung von chemischen oder biochemischen Analyten über die Anbindung an eine elektrochemisch aktive Substanz mit Hilfe von Mikroelektroden, welche gekennzeichnet ist durch einen Meßzellenverbund (analog einer Mikrotiterplatte), deren Boden leitfähig beschichtet ist, und mehreren der Zeilen- oder Spaltenzahl des Meßzellenverbundes angepaßten und im Meßzellenabstand voneinander parallel angeordneten positionierbaren Mikroelektroden, die unabhängig voneinander in ihrer Höhe variiert werden können. Diese Vorrichtung gestattet die automatisierte, simultane Durchführung des erfindungsgemäßen Analyseverfahrens (Abb. 6).

4. Vorrichtung zur Bestimmung von chemischen oder biochemischen Analyten über die Anbindung an eine elektrochemisch aktive Substanz mit Hilfe von Mikroelektroden, welche gekennzeichnet ist durch eine Positionierung der Mikroelektrode und der Referenz- und Gegenelektrode, zumindest jedoch einer Referenzelektrode, in einem auf der Regenerationsoberfläche aufgetragenen Tropfen unter Verzicht auf eine Meßzellenwand. Das Volumen des Tropfens ist nach oben durch die Oberflächenspannung des verwendeten Elektrolyten, nach unten durch die Positioniergenauigkeit der Mikroelektrode mit Referenzelektrode über der Regenerationsoberfläche begrenzt. Erfindungsgemäß beträgt das Tropfenvolumen bevorzugt 0.001 – 500 μ l, insbesondere 1 – 100 μ l (Abb. 7). Die Vorrichtung ist optional weiterhin dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende Probenlösung entweder mittels einer Mikrokapillare durch iontophoretische Injektion, durch Kapillarkräfte, bzw. unter Verwendung von Mikropumpen oder mittels einer Düse, bevorzugt einem Piezodispenser, als Mikrotröpfchen, eventuell auch berührungslos über einen Luftspalt, in den das Meßvolumen bestimmenden Elektrolyttropfen eingebracht wird.

Das erfindungsgemäße Meßverfahren wird im folgenden beispielhaft unter Nutzung der Vorrichtung 1 und anhand der Cyclovoltammetrie als dem zur Anwendung kommenden elektrochemischen Verfahren erläutert; die Übertragung der Erläuterungen auf andere elektrochemische Meßverfahren wie der Amperometrie bei konstantem Potential, unterschiedlicher Puls-Voltammetrieverfahren, Chronoamperometrie etc. sind einem Fachmann möglich. Im cyclovoltammetrischen Experiment bewirkt ab einem bestimmten Potentialwert eine weitere Potentialerhöhung keine weitere Erhöhung des Faraday'schen Stromes. Die Parameter, die diesen diffusionskontrolliert fließenden Grenzstrom bestimmen sind die Elektrodengröße, die Konzentration der Redoxspezies, die Zahl der pro Formelumsatz übertragenen Elektronen, sowie der Diffusionskoeffizient der Redoxspezies. Der Diffusionskoeffizient ist für das erfindungsgemäße Verfahren von besonderer Bedeutung, da die Regeneration des Redoxmediators durch seine wechselseitige Diffusion zwi-

schen der Mikromeßelektrode und der Regenerationsoberfläche bestimmt wird.

Wird nun die komplementäre Erkennungsstruktur (das heißt die zu bestimmende Substanz) zum am Redoxmediator gebundenen Erkennungselement zugegeben, so erfolgt die molekulare Erkennung unter Bildung eines Affinitätskomplexes zwischen den komplementären Strukturen mit einer für das gewählte Erkennungssystem spezifischen Affinitätskonstanten (Bindungskonstante). Nach einer Inkubationszeit, die entweder ausreichend ist, um die Gleichgewichtskonzentration des Affinitätskomplexes zu erhalten, oder die exakt reproduziert werden muß, ist der mittlere Diffusionskoeffizient des an der Mikroelektrode umzusetzenden Redoxmediators infolge der Vergrößerung des Molekulargewichtes erniedrigt. Wird die Erkennungsstruktur in fester Form zugegeben, so bleiben die Parameter Elektrodengröße, Abstand Mikroelektrode/Regenerationsoberfläche, Zahl der ausgetauschten Elektroden und Konzentration des Redoxmediators konstant. Die erfolgte Abnahme des diffusionskontrolliert fließenden Faraday-Stromes im erneuten cyclovoltammetrischen Experiment ist somit ausschließlich auf die Modulation des Diffusionskoeffizienten als Folge der molekularen Erkennungsreaktion zurückzuführen. Die Abnahme des Stromes ist dabei ein Maß für die gebildete Menge des Affinitätskomplexes. Die Differenz der Diffusionsgrenzströme in den vor und nach der Zugabe des Analyten aufgenommenen Cyclovoltammogrammen stellt somit das auszuwertende Meßsignal des erfindungsgemäßen Verfahrens dar. Aufgrund der hohen Spezifität der molekularen Erkennungsreaktion besitzt dieses Verfahren eine geringe Querempfindlichkeit, so daß eine vorherige Probenaufbereitung zumeist entfallen kann.

Alternativ läßt sich das Erkennungselement auch in Lösung zugeben. Wichtig hierbei ist, daß sich nun neben dem Diffusionskoeffizienten des Redoxmediators auch die Konzentration ändert. Um diesen Effekt möglichst gering zu halten, ist es erforderlich, das zugegebene Probevolumen im Vergleich zum Volumen der Redoxmediatorlösung in der Meßzelle möglichst gering zu halten, oder die Konzentrationsabnahme durch die Volumenvergrößerung rechnerisch oder durch eine einmal aufgenommene Kalibrierfunktion, die nur den Volumenzuwachs berücksichtigt, zu eliminieren.

Weiterhin ist es auch möglich, Probe und Redoxmediatorlösung vor der Messung zu vermischen und nach der Inkubationszeit mit nur einer elektrochemischen Messung zu untersuchen. Der Gehalt des Analyten in der Probe kann dann über eine mit Standardlösungen erhaltene Kalibrierfunktion erhalten werden.

Im Falle eines Analyten, der mehrere Bindungsstellen besitzt, kann das Meßverfahren auf ein Sandwich-Konzept erweitert werden. Bei identischen Bindungsstellen setzt man in einem ersten Reaktionsschritt einen Überschuß des Analyten zur Redoxmediatorlösung zu. Aufgrund des Überschusses können nicht alle Bindungsstellen des Analyten mit Redoxmediatormolekülen besetzt werden, so daß statistisch einige Bindungsstellen eines Analytmoleküls mit dem Redoxmediator besetzt sind und einige frei sind. Bei verschiedenen Bindungsstellen genügt eine Absättigung aller Bindungsstellen des Analyten, die den Redoxmediator binden können. Die erfolgreiche Anbindung kann durch das beschriebene Meßverfahren kontrolliert werden.

Die freien Bindungsstellen stellen die Grundlage für den Sandwich-Assay dar, da über diese ein weiteres zu dieser Bindungsstellen komplementäres Erkennungselement anbinden kann und somit die Molmasse des Redoxmediators weiter zunimmt, was zu einer weiteren Verringerung des Diffusionskoeffizienten der Redoxspezies führt. Dieses läßt sich über resultierende Abnahme des Diffusionsgrenzstromes

mit dem beschriebenen Meßverfahren detektieren.

Die Besonderheit des Meßverfahrens der vorliegenden Erfindung ist die zusätzliche Verstärkung des Meßeffektes durch den positiven Feedback-Effekt (Redoxmediatorrecycling) an der Regenerationsoberfläche, der einfach durch Annäherung der Mikromeßelektrode an die Regenerationsoberfläche erreicht werden kann, und über die Variation des Abstand zwischen Mikroelektrode und Regenerationsoberfläche an die Erfordernisse von verschiedenen Analyten angepaßt werden kann. Hier liegt ein klarer Vorteil gegenüber Verstärkungsmechanismen, die an aufwendig herzustellen den Interdigital-Elektroden zustande kommen, und an denen dieser Verstärkungseffekt nicht moduliert werden kann. Das erfindungsgemäße Analysenverfahren und die Vorrichtungen weisen den Vorteil auf, daß lediglich ein Monopotentialstat benötigt wird, da im allgemeinen lediglich der Mikromeßelektrode Potentiale aufgeprägt werden müssen. Die zur Anwendung kommenden Mikroelektroden können durch Polieren mit Polierpasten gereinigt werden, so daß sie über eine große Zahl von Analysen reproduzierbar verwendet werden können.

7 Beispiele

Im folgenden wird das der Erfindung zugrunde liegende Prinzip anhand von Beispielen erläutert:

7.1 Biotin/Streptavidin Assay unter Verwendung von Vorrichtung 1

Als Redoxmediator wird ein mit Biotin modifiziertes Ferrocenderivat verwendet. Die Darstellung gelingt über die Umsetzung eines wasserlöslichen Ferrocen-Alkylamins mit Hydroxysuccinimid-Biotin. Die Reaktionsprodukte werden mit Hilfe einer mit monomeren Avidin beschichteten Säule getrennt. Als Mikroelektrode dient eine glasummantelte Platinmikroelektrode mit einem Durchmesser der aktiven Elektrodenoberfläche von 50 µm. Als elektrochemisches Detektionsverfahren dient die cyclische Voltammetrie.

Abb. 8 (Kurve 1) zeigt ein Cyclovoltammogramm (Lösungsvolumen 300 µl; Vorrichtung 1) des biotinierten Ferrocen-Komplexes (im folgenden Fc-Biotin genannt). **Abb. 8** (Kurve 2) zeigt das Cyclovoltammogramm nach Zugabe von 8 µl 0.1 M Phosphatpuffer (pH 7). Die sehr geringe Abnahme des Faraday'schen Stromes ist auf die Volumenvergrößerung zurückzuführen. Die Kurven 3–5 zeigen die Cyclovoltammogramme nach der Zugabe von jeweils 8 µl einer 0.15 mM Streptavidinlösung.

Aufgrund der Erniedrigung des Diffusionskoeffizienten des Fc-Biotins durch die Anbindung des Streptavidins nimmt der Faraday-Strom an der Mikroelektrode ab.

Nach mehrfacher Zugabe des Analyten tritt Sättigung ein (**Abb. 8**, Kurve 5).

Abb. 9 zeigt eine analoge Messung unter Nutzung des Redoxrecycling an der der Mikromeßelektrode gegenüberliegenden Regenerationsoberfläche. Die im Vergleich zu **Abb. 8** wesentlich höheren Ströme zeigen den erwarteten Verstärkungseffekt.

Dieser Verstärkungseffekt wird in **Abb. 10** verdeutlicht, in der die Faraday'schen Ströme, normiert auf den Anfangsstrom vor der Zugabe von Streptavidin, gegen die Streptavidinkonzentration in der Meßzelle aufgetragen ist.

Die Messung mit Verstärkung durch Redoxrecycling zeigt eine um den Faktor 3 erhöhte Sensitivität. Für das hier gezeigte Beispiel lassen sich mit dem beschriebenen Verfahren Konzentrationen von Streptavidin von 1–10 µmol/l bestimmen.

7.2 Biotin/Streptavidin Assay unter Verwendung von Vorrichtung 4

Eine weitere Verringerung der einzusetzenden Substanzmengen läßt sich durch die Anwendung des Meßverfahrens in "freier" Umgebung ohne die Volumenbegrenzung durch Meßzellen erreichen.

Eine Mikroelektrode wird senkrecht sehr dicht an eine makroskopische Elektrode angenähert. Anschließend werden 20 µl Redoxmediatorlösung zudosiert, so daß sich eine die Mikro- und Makroelektrode umschließender Tropfen bildet. In diesen werden zusätzlich ein chloridierter Silberdraht als Pseudo-Referenzelektrode und ein Platindraht als Gegenelektrode eingetaucht. Der Meßvorgang kann nach dem bereits beschriebenen Meßprinzip mit oder ohne Redoxamplifizierung erfolgen. Die Zugabe der Probe erfolgt aufgrund der kleinen Gesamtvolumina in einer für feste und flüssige Proben unterschiedlicher Weise. Im Falle fester Proben wird diese in einer Redoxmediatorlösung, welche die gleiche Konzentration an Redoxmediator aufweist wie die Referenz-Meßlösung, gelöst. Im Falle flüssiger Proben wird durch Vermischung der Probelösung mit einer höher konzentrierten Redoxmediatorlösung eine Lösung hergestellt, welche die gleiche Konzentration an Redoxspezies wie die Referenz-Meßlösung des Tropfens besitzt. Volumina bis zu 50 µl dieser Probenlösungen können in den Tropfen injiziert werden. Da Meß- und Referenz-Probenlösung die gleiche Konzentration an Redoxspezies besitzen, müssen Verdünnungseffekte nicht berücksichtigt werden. Abb. 11 Kurve 1 zeigt ein mit dieser Versuchsanordnung aufgenommenes Cyclovoltammogramm von Fc-Biotin mit Redoxamplifizierung. Über das beschriebene Verfahren wurden 0.1 mg Streptavidin in 15 µl Meßlösung in den freien Tropfen zudosiert. Das entsprechende Cyclovoltammogramm (Abb. 11 Kurve 2) zeigt die resultierende Stromabnahme des Diffusionsgrenzstromes. Bei einer weiteren Zugabe von Streptavidin befindet sich das System bereits im Sättigungsbereich, so daß keine weitere signifikante Abnahme des Diffusionsgrenzstroms zu verzeichnen ist (Abb. 11 Kurve 3).

7.3 Sandwich Assay

Biotin/Streptavidin/Biotinderivat unter Verwendung von Vorrichtung 1

Zur Demonstration eines Sandwich-Assays wird auf das bereits beschriebene Biotin-Streptavidin-System zurückgegriffen. Als zusätzlicher Analyt zum Anbinden an die freien Bindungsstellen von Streptavidin wird beispielhaft mit Biotin modifizierte Glucoseoxidase (im folgenden GOD-Biotin genannt) verwendet. Die Darstellung dieser Verbindung gelingt über die Umsetzung von Glucoseoxidase mit Hydroxysuccinimid-Biotin und anschließender Trennung der Reaktionsprodukte über eine monomere Avidin-Säule. Die Durchführung der Messung erfolgt nach Annäherung der Mikroelektrode an die Regenerationsoberfläche unter Wirkung der Redoxamplifizierung (siehe Abschnitt 7.1). Abb. 12 Kurve 1 zeigt das Cyclovoltammogramm von Fc-Biotin mit Redoxamplifizierung. Abb. 12 Kurve 2 zeigt das Cyclovoltammogramm nach Zusatz eines Überschusses von Streptavidin. Das Cyclovoltammogramm in Abb. 12 Kurve 3 zeigt die auf die Volumenzunahme um 15 µl Phosphatpuffer zurückzuführende Stromabnahme. Abb. 12 Kurve 4 zeigt das Cyclovoltammogramm nach Zugabe von 15 µl GOD-Biotin-Lösung. Die Abnahme des Faraday'schen Stromes ist wesentlich höher als die durch die Volumenzunahme verursachte Stromabnahme. Diese ist auf die weitere Abnahme des Diffusionskoeffizienten der Redoxspezies zurückzufüh-

ren. Weiterhin zu bemerken ist, daß die Abnahme viel größer ist als im Falle des Biotin-Streptavidin-Systems. Zum einen ist die Molmasse von Glucoseoxidase mit ca. 186.000 Dalton fast um das 2.8-fache größer als die von Streptavidin (ca. 67.000 Dalton), zum anderen besitzt das Glucoseoxidasemolekül mehrere Aminogruppen, die mit Biotin derivatisiert werden können. Dies kann dazu führen, daß durch die Verknüpfung von mehreren biotinilierten Glucoseoxidasemolekülen über ein Streptavidinmolekül oder ein "Streptavidin-Fc-Biotin"-Molekül mit mindestens zwei freien Bindungsstellen sehr große Redoxmediatoren entstehen, die einen entsprechend niedrigen Diffusionskoeffizienten besitzen.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von chemischen oder biochemischen Analyten, **gekennzeichnet dadurch**, daß der Diffusionskoeffizient einer redoxaktiven Spezies, die mit einem spezifischen Erkennungselement gekoppelt ist, durch Anbindung einer komplementären Erkennungsstruktur moduliert wird, und die Modulation des Diffusionskoeffizienten mit einem elektrochemischen Verfahren unter Verstärkung durch Recycling der Redoxspezies detektiert wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Meßelektrode Makro- oder Mikroelektroden mit einem aktiven Durchmesser zwischen 0.1 und 500 µm, bevorzugt 1–100 µm, insbesondere 10–50 µm eingesetzt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßelektrode eine Scheibenelektrode ist, die von einem isolierenden Mantel aus Glas oder Polymeren umgeben ist, der die Diffusion von Redoxspezies zur aktiven Elektrodenoberfläche moduliert.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Meßelektrode mittels Positionierelementen einer makroskopischen leitenden Oberfläche soweit angenähert werden kann, daß das Diffusionsprofil der mit einem spezifischen Erkennungselement gekoppelten Redoxspezies durch diese Oberfläche verändert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das an den Redoxmediator gekoppelte Erkennungselement Biotin, ein Hapten, ein Antigen, ein Antikörper, ein Lectin, ein Kohlehydrat, ein DNA-Fragment, ein DNA-Halbstrang, ein RNA-Fragment, ein Oligonucleotid, ein Hormon, ein Rezeptor oder ein künstliches Wirtsmolekül ist, für das eine komplementäre Erkennungsstruktur existiert, die selektiv gebunden wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der zu bestimmende Analyt Streptavidin, Avidin, Biotin, ein Hapten, ein Antigen, ein Antikörper, ein Lectin, ein Kohlehydrat, ein DNA-Fragment, ein DNA-Halbstrang, ein RNA-Fragment, Streptag I oder II modifizierte Proteine, His-Tag-modifizierte Proteine, ein Oligonucleotid, ein Hormon, ein Rezeptor oder ein künstliches Wirtsmolekül ist, vorausgesetzt, daß dieser Analyt durch komplementäre Erkennung an den Redoxmediatormodifizierten Partner spezifisch gebunden werden kann.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß über eine Zwischenstruktur mit mehr als einer gleichartigen oder unterschiedlichen Bindungsstelle der Redoxmediator und der Analyt spezifisch erkannt und gebunden werden kann, so daß ein Sandwich-Assay entsteht.

8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Anwendung kommenden elektrochemischen Verfahren durch den Diffusionskoeffizient der Redoxspezies bestimmt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrochemischen Verfahren die cyclische Voltammetrie, die Chronoamperometrie, die Chronocoulometrie, die Differential-Puls-Voltammetrie, die Normal-Puls-Voltammetrie, die Square-Wave-Voltammetrie, die Amperometrie bei konstantem Potential sind.
10. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet dadurch, daß die Redoxspezies, die mit dem spezifischen Erkennungselement gekoppelt wird, an einer Mikroelektrode mit hoher heterogener Durchtrittskinetik reversibel oxidierbar oder reduzierbar sind.
11. Verfahren nach Anspruch 1 und 10, gekennzeichnet dadurch, daß die Redoxspezies ein Osmium-Komplex, ein Ferrocenderivat, eine Ferrocendendrimer ist.
12. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß in eine Meßzelle mit Referenzelektrode, Gegenelektrode und makroskopischer Regenerationsoberfläche mit einem Volumen von 10 µl-1 ml, bevorzugt einem Volumen < 300 µl eine Mikroelektrode nach Anspruch 2 mittels Positionierelementen an die Regenerationsoberfläche angenähert werden kann.
13. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrochemische Meßzelle als ein Meßzellenarray ausgebildet ist, insbesondere nach Art von Mikrotiterplatten, dessen Boden eine gemeinsame oder mehrere getrennte leitende Regenerationsoberflächen bilden.
14. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß die elektrochemische Meßzelle keine Wände aufweist, die von der Reaktionslösung berührt werden.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Redoxmediatorlösung über eine die Mikroelektrode umschließende Kapillare zudosiert wird, so daß sich ein das leitende Substrat und die Spitze der Mikroelektrode umgebender Tropfen bildet.
16. Vorrichtung nach Anspruch 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillare gleichzeitig als Referenzelektrode ausgebildet ist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Kapillare ein Silberrohr bzw. ein mit Silber beschichtetes Rohr ist, das wiederum mit Silberchlorid beschichtet ist.
18. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die benutzten Reaktionsvolumina in den Größenordnungen von Tropfen liegen, speziell im Bereich von 1 nl bis 100 µl, insbesondere im Bereich von 5 µl bis 50 µl.
19. Verfahren nach Anspruch 1 unter Nutzung einer der Vorrichtungen nach Anspruch 14-17, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenlösung über eine Kapillare in den Tropfen der Redoxmediatorlösung dosiert wird.
20. Verfahren nach Anspruch 1 und 19 unter Nutzung einer der Vorrichtungen nach Anspruch 14-17, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenlösung mittels einer Mikrodosierpumpe oder durch iontophoretische Injektion in den Tropfen der Redoxmediatorlösung dosiert wird.
21. Verfahren nach Anspruch 1 unter Nutzung einer der Vorrichtungen nach Anspruch 14-17, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenlösung mittels eines Pie-

zodispensers als Mikrotropfen, eventuell auch berührungslos über einen Luftspalt, in den Tropfen der Redoxmediatorlösung dosiert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sequentiell mehrere Proben unter Nutzung einer gemeinsamen oder einzelner leitender Regenerationsoberflächen vermessen werden können.

23. Vorrichtung nach Anspruch 13 zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Mikroelektrode mittels Positionierelementen die Positionen des Meßzellenarrays sequentiell mit hoher Positioniergenauigkeit anfahren kann.

24. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß mittels unabhängiger Positionierelemente mehrere Mikroelektroden parallel in mehreren Meßzellen oder Tropfen der Meßlösung an die jeweilige Regenerationsoberfläche angenähert werden können, so daß gleichzeitig mehrere Proben vermessen werden können.

25. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe nach Aufnahme einer Referenzmessung in fester Form zugegeben wird, in gelöster Form hinzugegeben wird, oder vor dem Vermessen mit der Redoxmediatorlösung vermischt wird.

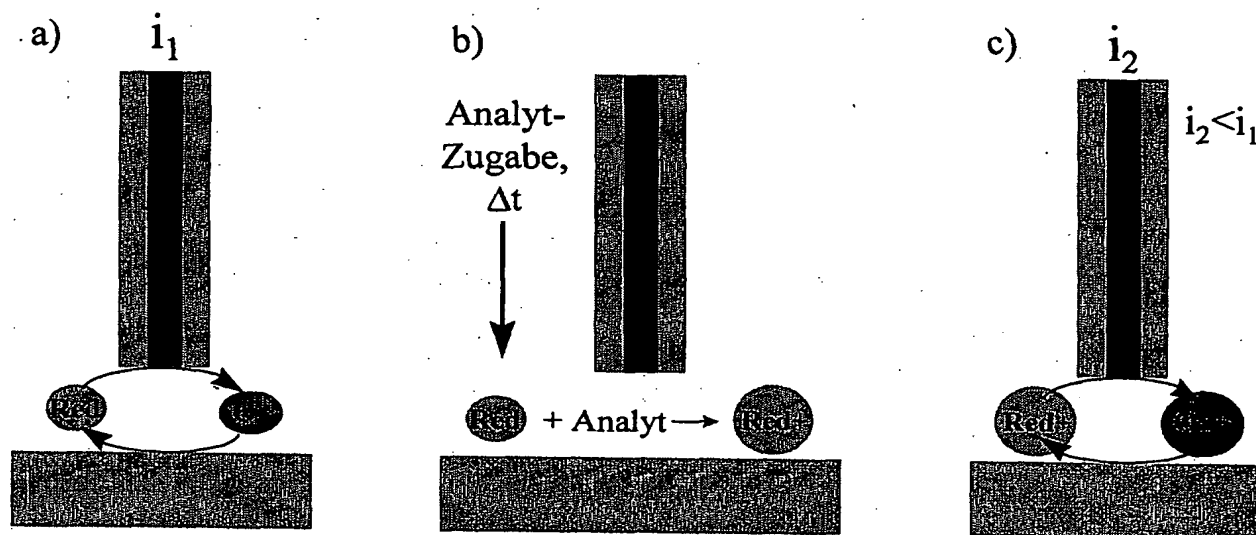
26. Vorrichtung nach Anspruch 12, 13, 14 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß mittels eines Potentiostaten an der oder den Mikroelektrode Potentialprofile für die in Anspruch 8 und 9 genannten elektrochemischen Verfahren aufgeprägt werden können.

27. Vorrichtung nach Anspruch 12, 13, 14 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß die makroskopische leitende Regenerationsoberfläche eine Scheibenelektrode, eine Metall- oder eine Metallbedampfte planare Oberfläche ist.

28. Vorrichtung nach Anspruch 12, 13, 14 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Regenerationsoberfläche entweder entsprechend der Nernst-Gleichung das durch den Oxidationszustand des Redoxmediators gegebene Potential annimmt oder mittels eines Bipoten-tiostaten auf ein konstantes oder sich zeitlich änderndes Potential relativ zum Potential der Referenzelektrode polarisiert wird.

Hierzu 10 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

**Abbildung 3:**

- a) Annäherung der Mikroelektrode an die Regenerationsoberfläche und Bestimmung des Stromes i_1
- b) Zugabe des Analyten und Inkubation
- c) Bestimmung des Stroms i_2 nach Inkubation mit dem Analyten und Auswertung anhand von Kalibrierkurven

9 Zeichnungen

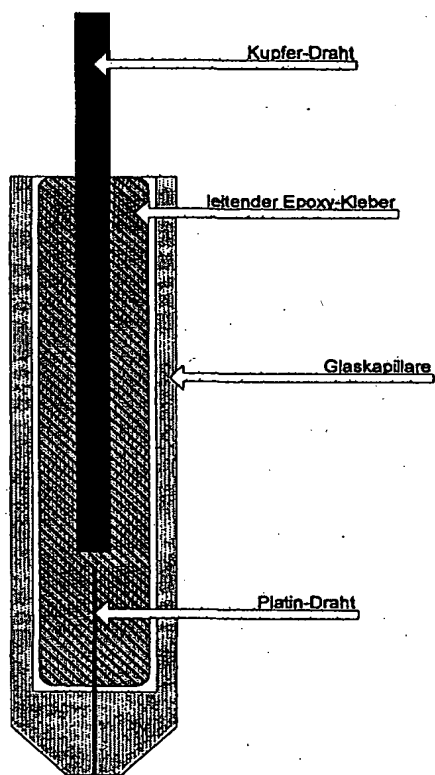
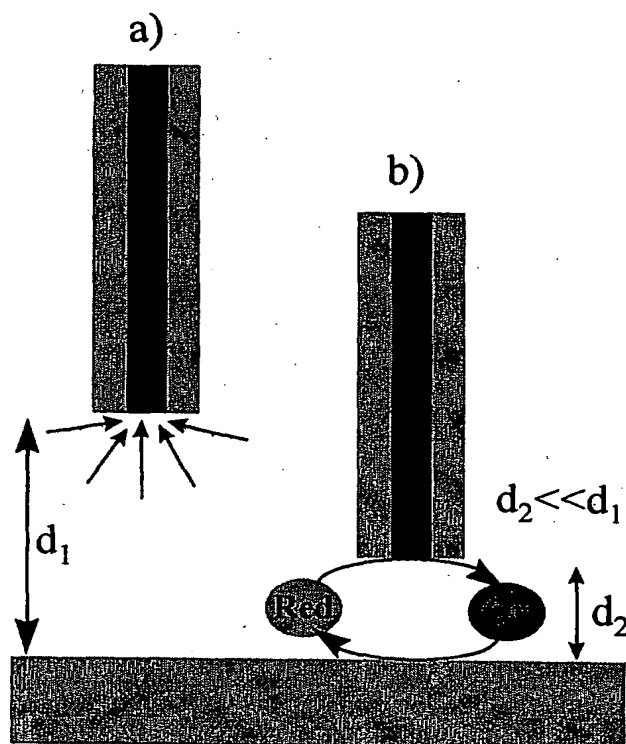


Abbildung 1: Mikroelektrode

**Abbildung 2:****a) hemisphärisches Diffusionsfeld
einer Mikroelektrode****b) elektrochemisches Recycling an
einer leitenden Oberfläche**

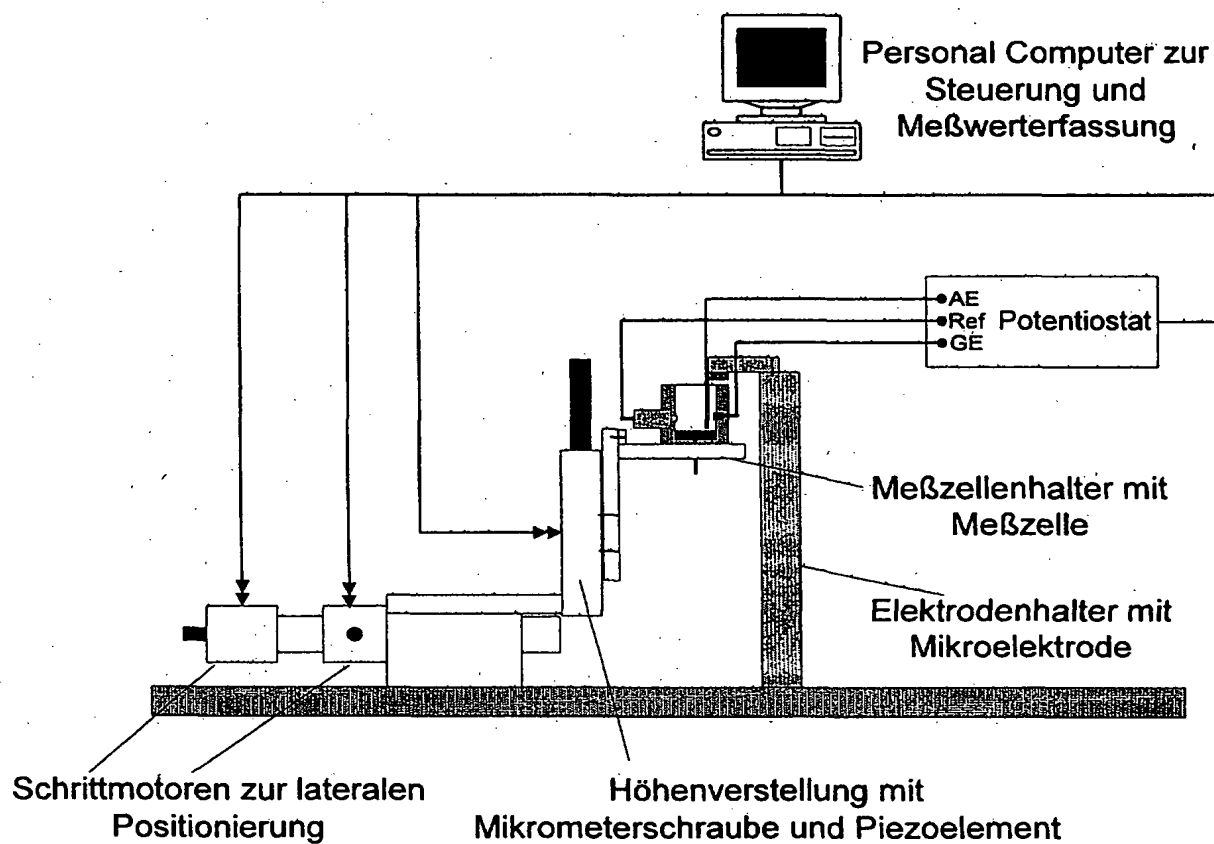


Abbildung 4: schematische Darstellung von Vorrichtung 1

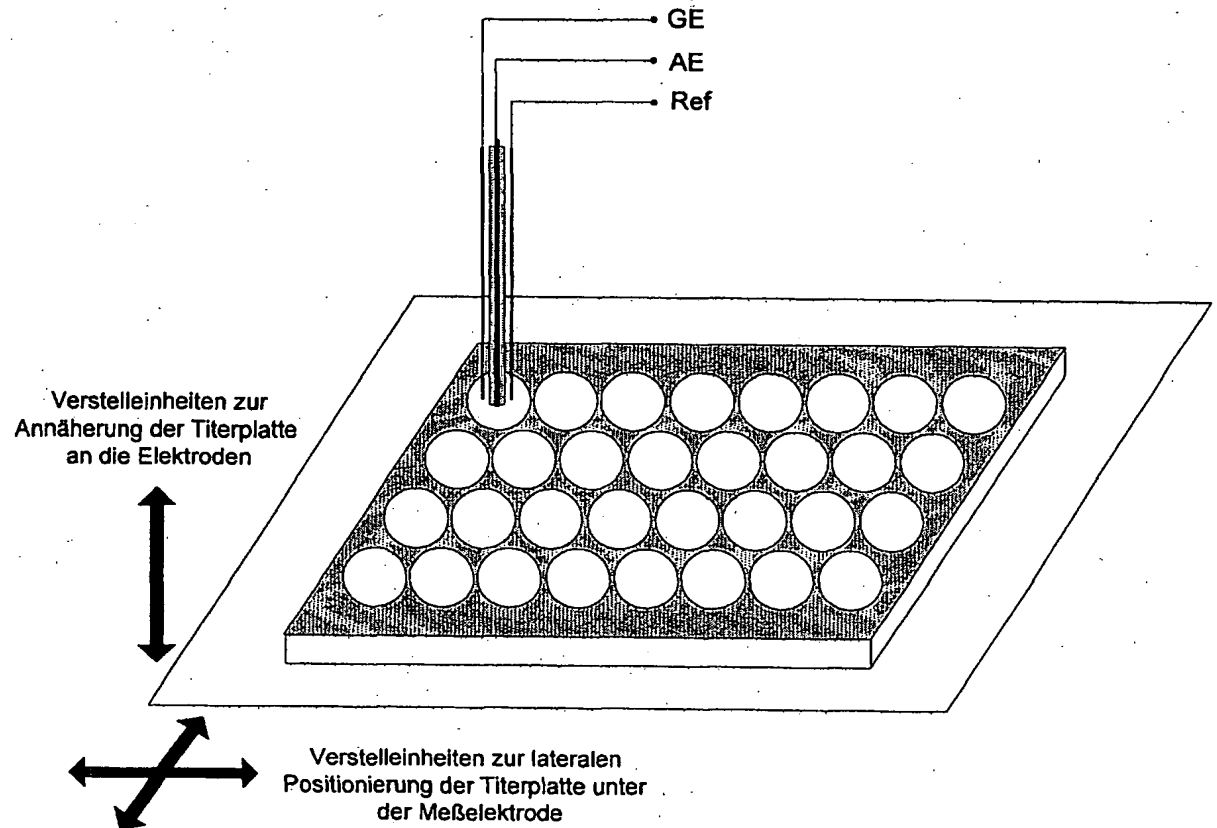


Abbildung 5: schematische Darstellung von Vorrichtung 2

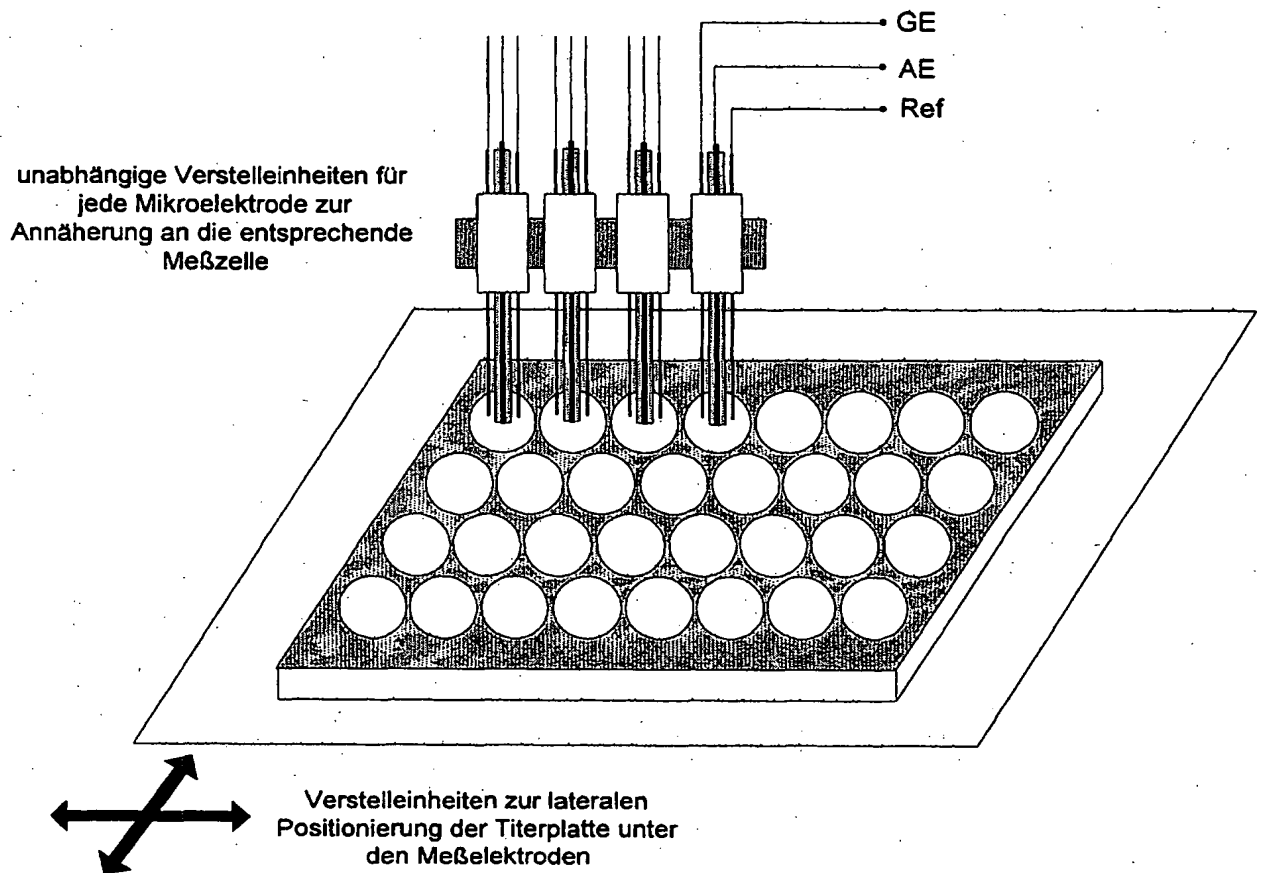


Abbildung 6: schematische Darstellung von Vorrichtung 3

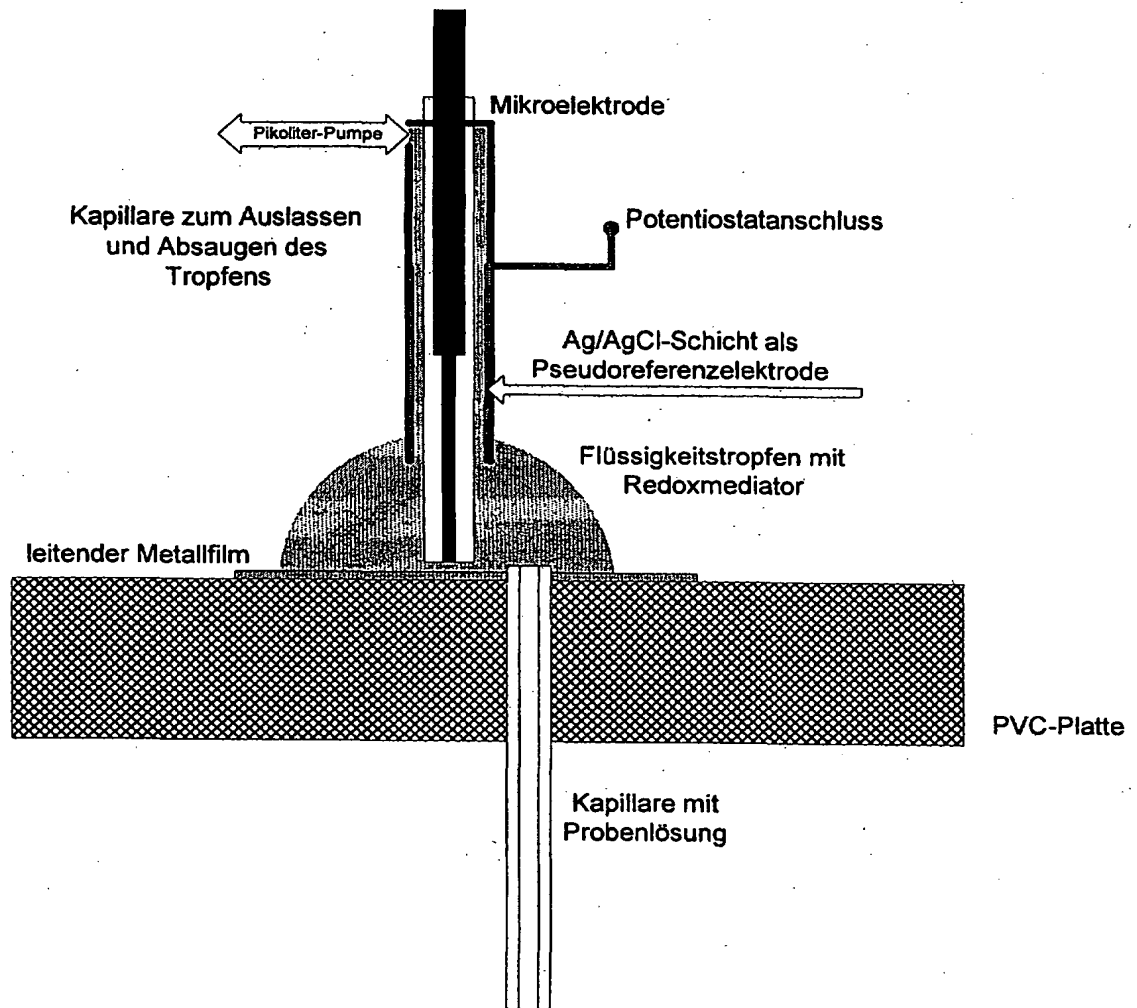


Abbildung 7: schematische Darstellung von Vorrichtung 4

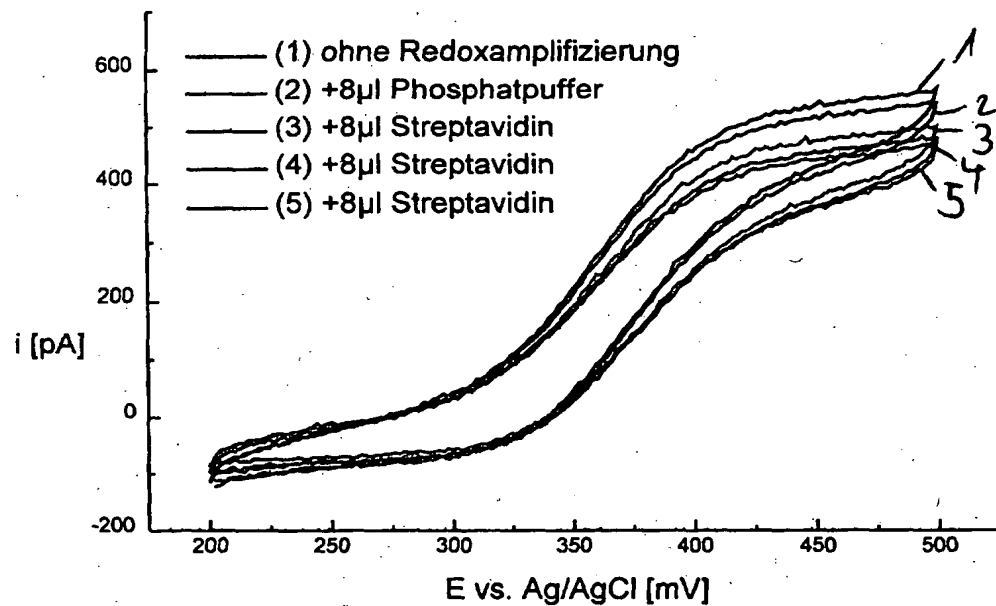


Abbildung 8: Biotin-Streptavidin-Assay ohne Redoxamplifizierung unter Verwendung von Vorrichtung 1

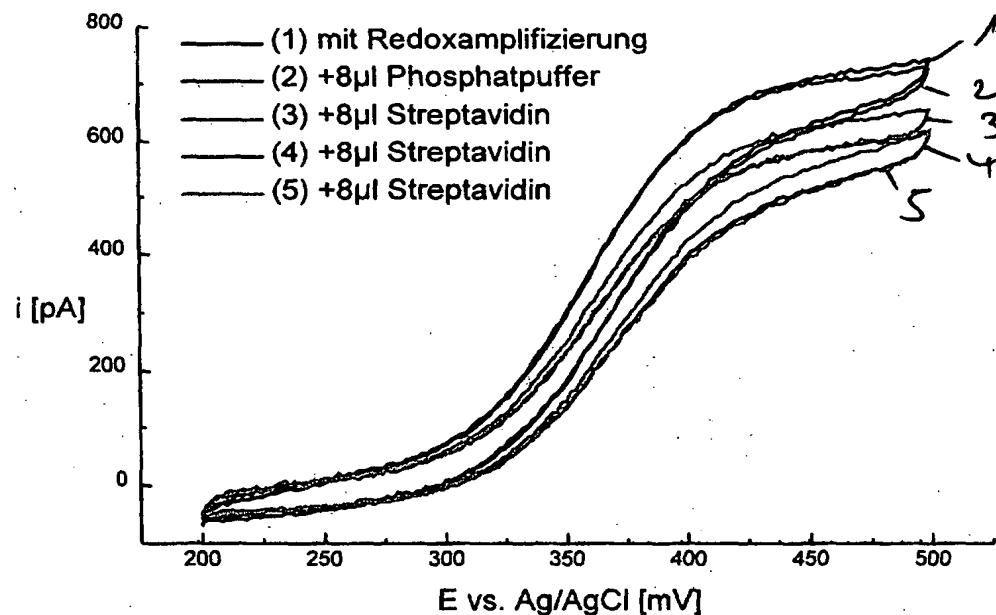


Abbildung 9: Biotin-Streptavidin-Assay mit Redoxamplifizierung unter Verwendung von Vorrichtung 1

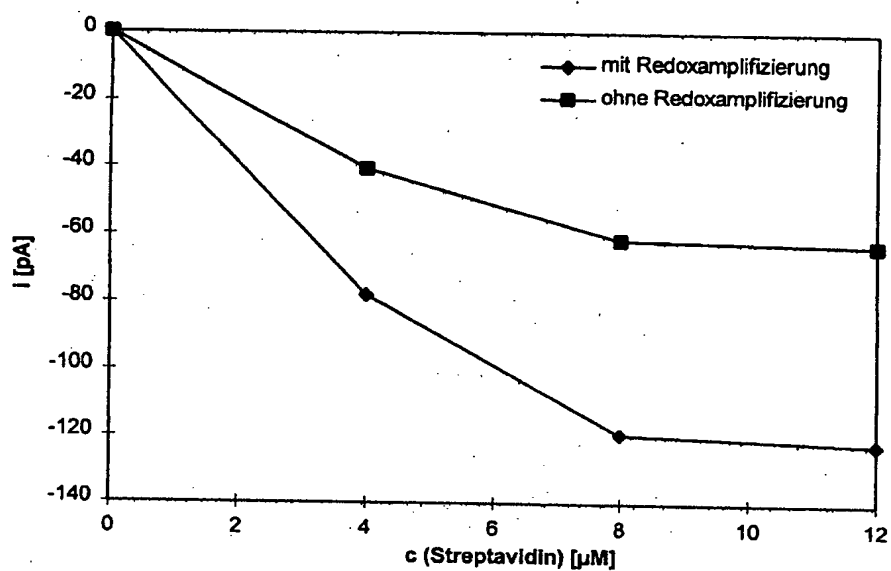


Abbildung 10: Kalibrierkurven Biotin-Streptavidin-Assay mit und ohne Redoxamplifizierung

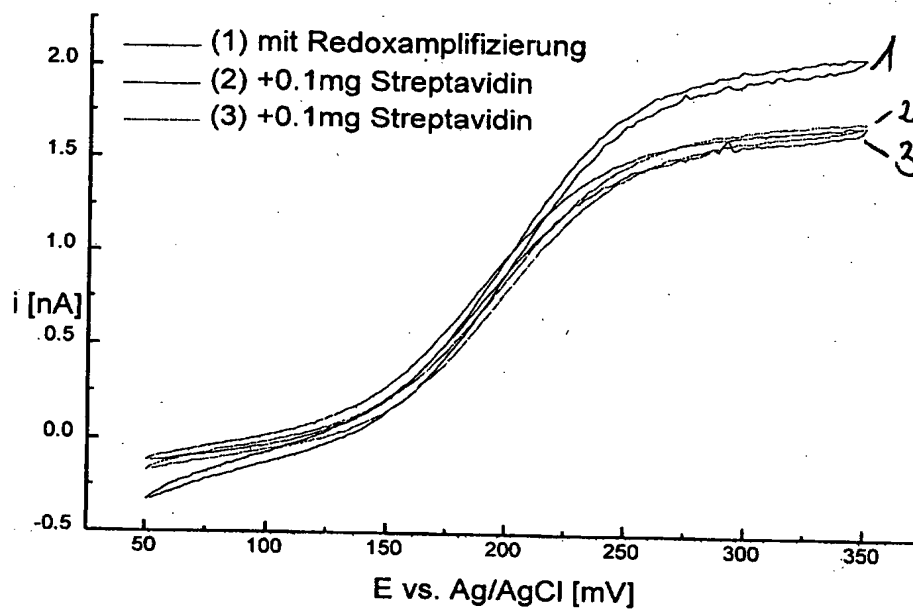


Abbildung 11: Biotin-Streptavidin-Assay mit Redoxamplifizierung unter Verwendung von Vorrichtung 4

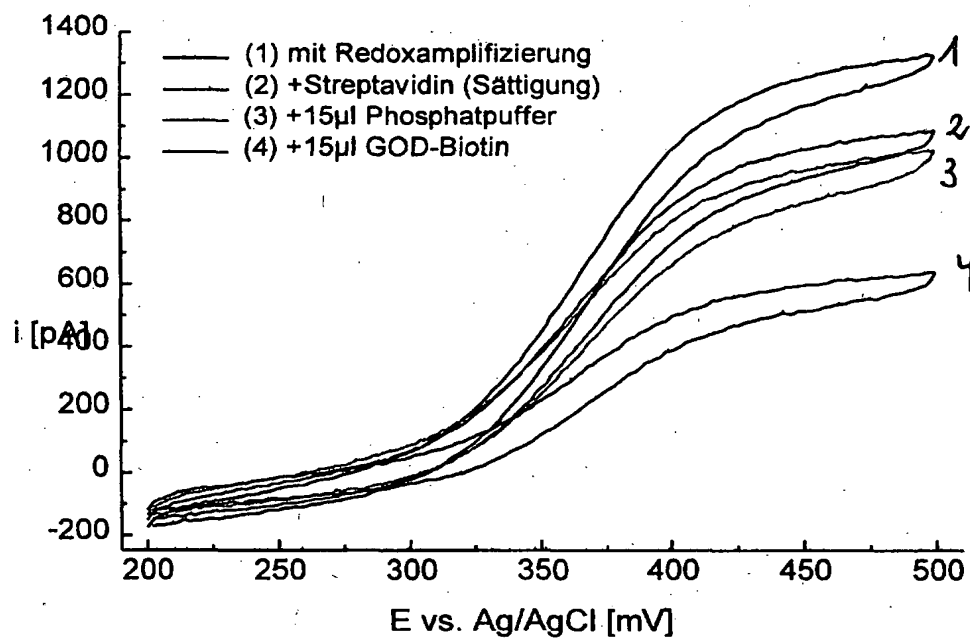


Abbildung 12: Sandwich-Assay Biotin-Streptavidin-(GOD-Biotin) mit Redoxamplifizierung unter Verwendung von Vorrichtung 1